

Received: 2007.11.19
Accepted: 2008.02.19
Published: 2008.03.10

Rodzina białek Rho i ich rola w cytoszkielecie komórki

The Rho protein family and its role in the cellular cytoskeleton

Jakub Marcin Nowak, Alina Grzanka, Agnieszka Żuryń, Aleksandra Stępień

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, UMK w Toruniu – Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

Streszczenie

Białka z rodziny Rho (RhoA, Rac1, Cdc42) działają na zasadzie molekularnych przełączników, regulują wiele procesów komórkowych. Zaangażowane są m.in. w migrację komórek, kontrolę cyklu komórkowego, procesy apoptozy i regulację transkrypcji genów. Białka Rho są aktywne przede wszystkim w cytoszkielecie komórki, biorąc udział w reorganizacji mikrofilamentów aktynowych oraz mikrotubul. W ciągu ostatnich lat dokonał się znaczący postęp w zrozumieniu biochemicznej i genetycznej natury wielu procesów, w które są zaangażowane białka Rho. Pozostaje jednak wiele niewiadomych oraz wymagających potwierdzenia hipotez. Jednocześnie pojawiają się coraz nowsze i bardziej precyzyjne wyniki badań, pozwalające na zrozumienie procesów kontrolowanych przez białka Rho. Sugerowane jest między innymi zastosowanie ich w terapii pewnych schorzeń.

Celem niniejszej pracy jest próba scharakteryzowania znaczenia rodziny białek Rho w cytoszkielecie komórki.

Słowa kluczowe:

białka Rho • cytoszkielet • aktyna

Summary

Proteins of the Rho protein family (RhoA, Rac1, Cdc42) work as molecular switches in the regulation of many cellular processes. They are involved in cell migration, cell-cycle control, apoptosis, and the regulation of gene transcription. Rho proteins show their activity mainly in the cell's cytoskeleton by taking part in the reorganization of microfilaments and microtubules. In recent years, significant progress has been made in understanding the biochemical and genetic nature of many processes controlled by Rho proteins. Although there are still several unknowns and hypotheses which require confirmation, newer and more precise experimental results allow us to better understand these processes. It has also been suggested to use Rho family proteins in the therapy of some diseases. The purpose of this study was to characterize the significance of Rho processes in the cellular cytoskeleton.

Key words:

Rho proteins • cytoskeleton • actin

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_62/11550.pdf

Word count:

3535

Tables:

1

Figures:

3

References:

39



Adres autora: dr Agnieszka Żuryń, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Collegium Medicum UMK, ul. Karłowicza 24, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: azuryn@cm.umk.pl

Wykaz skrótów: **ABP** – białka wiążące się z aktyną (actin binding proteins); **ARP2/3** – białko spokrewnione z aktyną 2/3 (actin related protein 2/3); **ATP** – adenozylo 5' trifosforan (adenosine 5'-triphosphate); **ATP-aza** – adenozylo 5' trifosfataza (adenosine 5'-triphosphatase); **DFF** – czynnik fragmentacji DNA (DNA fragmentation factor); **DH** – domena DH odpowiedzialna za wymianę nukleotydów w białkach GEF (1-Db1 homology); **DRF** – por. mDIA (diaphanous-related formins); **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); **ERM** – spokrewnione białka: ezryna, radaksyna i moesyza umocowujące mikrofilamenty do błony plazmatycznej, np. w mikrokosmkach (ezrin, radexin, moesin); **FAK** – kinaza FAK (focal adhesion kinase); **GAP** – białko indukujące aktywność GTP-azy małych białek G (GTPase accelerating protein); **GDI** – GDI wiąże nieaktywne białko Rho i hamują wymianę GDP na GTP (guanine nucleotide dissociation inhibitors); **GDP** – guanozylo-5'difosforan (guanosine-5'diphosphate); **GEF** – białko zaangażowane w wymianę GDP na GTP, aktywujące małe białka G (guanine nucleotide exchange factor); **GTP** – guanozylo-5'trifosforan (guanosine-5'triphosphate); **GTP-aza** – guanozylo-5'trifosfataza (guanosine-5'triphosphatase); **LIM** – białko LIM (LIM protein); **LIMK** – kinaza LIM (LIM kinase); **LPA** – kwas lizofosfatydowy (lysophosphatidic acid); **MAP** – białka towarzyszące mikrotubulom (microtubule associated proteins); **mDIA** – białko efektorowe małych białek G rodziny Rho (mammalian homologue of *Drosophila diaphanous*) (DIA=DRF); **Miro** – białko rodziny Rho występujące w mitochondrium (mitochondrial Rho); **MLC** – lekkie łańcuchy miozyny (myosine light chains); **MLCK** – kinaza lekkich łańcuchów miozyny (myosine light chains kinase); **MLCP** – fosfataza lekkich łańcuchów miozyny (myosine light chains phosphatase); **MAPK** – kinaza aktywowana przez mitogen (mitogen activated protein kinase); **PCD** – programowana śmierć komórki – apoptoza (programmed cell death); **PDGF** – czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (platelet-derived growth factor); **PH** – domena białek GEF (pleckstrin homology); **PIP₂** – fosfatydyloinozytylo-4,5-bisfosforan (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate); **Rac** – małe białko G z rodziny Rho; **Ras** – małe białko G kodowane przez protoonkogen *ras* będący homologiem wirusowego onkogeny zidentyfikowanego w wirusie mięsaka myszy (rat sarcoma); **Rb** – protoonkogenne fosfobiałko jądrowe (105 kDa), uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego (Rb protein, retinoblastoma protein); **Rho** – białko należące do rodziny małych białek G (Ras homologous); **ROCK** – kinaza zależna od Rho (Rho kinase); **SCAR/WAVE** – białka należące do rodziny białek WASP (WASP family verprolin homologous protein); **SRF** – czynniki transkrypcyjne aktywowane przez mitogeny surowicy (serum response factor); **WASP** – białka kodowane przez gen *wasp* (Wiskott-Aldrich syndrom protein).

RODZINA BIAŁEK RHO

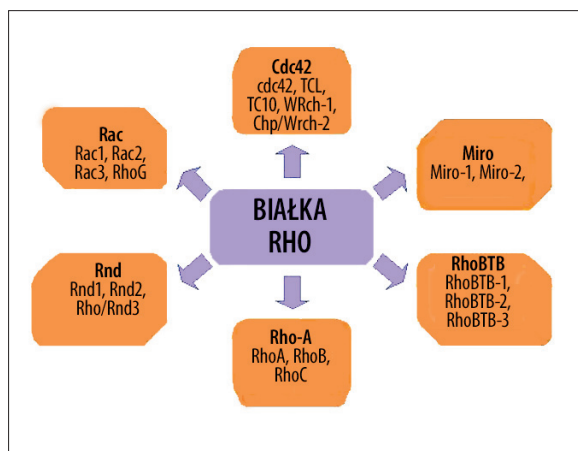
Białka Rho (Ras homologous) należą do nadrodziny małych białek G (białka Ras), które są monomerami o masie cząsteczkowej 20–30 kDa. Rho wiążą nukleotyd guaninowy (GTP lub GDP) [10,29].

Gen Rho odkryli w 1985 r. badacze pracujący nad glonem morskim *Aplasi*. Na podstawie sekwencji genu Rho wyizolowanego z *Aplasi* wyodrębniono trzy blisko spokrewnione geny ssacze, nazwane RhoA, RhoB oraz RhoC. Białko Rac natomiast, również należące do grupy białek Rho, zostało po raz pierwszy zidentyfikowane jako substrat transferazy C3 [29]. Był to zaledwie początek wielu odkryć związanych z tą rodziną białek. Dotąd zidentyfikowano ponad 100 różnych białek, należących do nadrodziny Ras, do których zaliczane są białka Rho. Rodzinę białek Rho podzielono na sześć podrodzin (ryc.1) uwzględniając zarówno podobieństwo w budowie, jak i pełnią funkcję [4].

Przynależność do rodziny białek Rho jest uwarunkowana obecnością domen GTP-azowych typowych dla tej rodziny białek. Cechą charakterystyczną tych struk-

tur jest obecność tzw. domeny Rho, która jest umiejscowiona pomiędzy piątym łańcuchem β a czwartą helisą α . Dzięki takiej budowie możliwe jest odróżnienie białek rodziny Rho od innych małych białek G. Większość Rho jest stosunkowo małymi białkami (190–250 reszt aminokwasowych) i składa się głównie z domeny GTP-azowej oraz krótkich elementów terminalnych na C-końcu i N-końcu [37]. Zidentyfikowano ponadto kilka nietypowych białek należących do tej rodziny zawierających dodatkowe domeny, które mogą mieć długość ponad 700 aminokwasów. Domeny GTP-azowe białek rodziny Rho wykazują homologię sekwencji aminokwasowej w 40–95%. Każde białko należące do tej rodziny ma sekwencję, dzięki której jest w stanie związać GTP lub GDP [37]. Białka te występują w dwóch postaciach: pierwsza związana z GTP – aktywna i druga nieaktywna wiążąca GDP, działają na zasadzie molekularnych przełączników (ryc. 2).

W postaci związanej z GTP są w stanie oddziaływać z efektorami lub cząsteczkami docelowymi zapoczątkowując łańcuch kolejnych reakcji [19,24,29,37]. Przejście w stan aktywny wymaga udziału dodatkowych białek re-



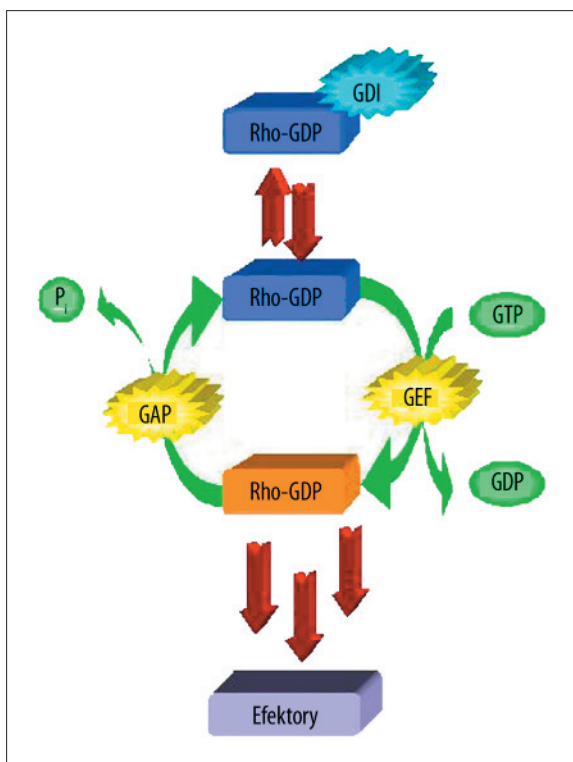
Ryc. 1. Białka rodziny Rho z podziałem na sześć głównych grup: Rho-A spokrewnione, Rac-spokrewnione, Cdc42-spokrewnione, białka Rnd, białka RhoBTB oraz białka Miro

gulatorowych. Białka regulujące aktywność GTP-az, do których zalicza się: GDI, GEF, GAP, odgrywają główną rolę w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych, pośredniczą w aktywowaniu czynników biorących udział w rearanżacji cytoszkieletu aktywnego oraz aktywują oksydazę NADPH u fagocytów [24,29]. Białka GEF zawierają dwie charakterystyczne domeny: DH (1-Db1 homology), odpowiedzialną za wymianę nukleotydów oraz domenę PH (pleckstrin homology), dzięki której białka te mogą się wiązać z fosfolipidami, np. błony cytoplazmatycznej [12,17]. Za swoistość szlaków sygnałowych związanych z białkami Rho są odpowiedzialne właśnie białka regulatorowe GEF, które oprócz tego, że są odpowiedzialne za aktywację białek rodziny małych GTP-az, wyznaczają również konkretną drogę przekazywania informacji przez białka Rho [17,20].

Koniec karboksylowy większości białek należących do podrodziny małych białek G ulega potranslacyjnej modyfikacji. Różnice w sekwencji C-końca oraz przemiany potranslacyjne wpływają na umiejscowienie białka wewnątrz komórki, determinując wiązanie z błoną, co istotnie wpływa na funkcję, jaką pełnią [37].

Białka homologiczne do Rho czy Rac zidentyfikowano u wszystkich organizmów eukariotycznych. Nie stwierdzono natomiast ich występowania u *Procarvota* [29].

Białka te, mimo że nie pełnią funkcji strukturalnych, często są umiejscowione w kilku różnych obszarach komórki. Mogą być również równomiernie rozproszone w cytoplazmie, a także wiązać się z błoną cytoplazmatyczną. Za przemieszczanie się, wiązanie i dysocjację białek Rho odpowiada swoista sekwencja końca karboksylowego tego białka, która podlega potranslacyjnej modyfikacji z udziałem lipidów. RhoGDI, jeden z czynników regulujących aktywność białka Rho, wiąże się z C-końcem białka, rozpoznając lipid znajdujący się na końcu karboksylowym, co w konsekwencji powoduje jego oddysocjowanie od błony cytoplazmatycznej i jednocześnie zahamowanie wymiany GDP-GTP. Ostatecznie białko Rho przyjmuje postać nieaktywną, wiążącą GDP i umiejscawia się w cytoplazmie [39]. Badania biochemiczne przeprowadzone przez



Ryc. 2. Regulacja cyklu GTP-az Rho. Przejście z postaci nieaktywnej Rho-GDP w postać aktywną Rho-GTP wymaga białek regulatorowych GDI, GAP i GEF. GDI wiąże nieaktywne białko Rho i hamuje wymianę GDP na GTP. GAP – białko indukujące aktywność GTP-azy małych białek G GEF – białko zaangażowane w wymianę GDP na GTP, aktywujące małe białka G (wg [8] zmodyfikowano)

Fleminga i wsp. [13] dowiodły, że odpowiedzialnymi za te procesy mogą być czynniki pozakomórkowe, takie jak kwas LPA, który stymuluje transport i wiązanie białek do błony cytoplazmatycznej.

Lokalizacja podrodziny małych białek G jest bardzo istotna, ponieważ umiejscowienie zwykle wiąże się z określoną funkcją białka. Rodzina białek Rho bierze udział w wielu różnorodnych procesach komórkowych, takich jak: organizacja cytoszkieletu, adhezja komórek, ich ruchliwość, egzocytoza czy transkrypcja. Bardzo istotne okazało się zbadanie dokładnej lokalizacji białek Rho w komórce podczas jej zmian morfologicznych oraz podczas odpowiedzi komórkowej na czynniki zewnętrzne. Yonemura i wsp. [39] wykazali obecność białek RhoA zarówno w błonie cytoplazmatycznej, jak i w samej cytoplazmie, a obserwowano komórki epitelialne oraz fibroblastyczne. Białka Rho gromadziły się w cytoplazmie, głównie w okolicach formujących się włókien naprężeniowych, ogniskach adhezyjnych oraz w bruzdzie podziałowej, a także w mikrowypustkach komórkowych. Udowodniono również, że Rho potrafią przemieszczać się i gromadzić w odpowiedzi na charakterystyczne czynniki stymulujące (lowostatyna – LPA) [39]. Na poziomie tkankowym zaobserwowano dużą liczbę tych molekularnych przełączników w komórkach mezotelialnych oraz nabłonka wielowarstwowego języka, w rzęskach komórek epitelialnych tchawicy, w nabłonku pęcherza moczowego, a także w wielu innych tkankach [13].

FUNKCJA BIOLOGICZNA

Białka Rho są zaangażowane w regulację różnych funkcji komórkowych. Zaobserwowano, że odgrywają one ogromną rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak: migracja komórek, regulacja transkrypcji czy transport pęcherzykowy. Dlaczego biorą one udział w tak wielu różnych procesach? Otóż białka te mają zdolność współdziałania z wieloma efektorami [11,20,29].

Odkryto, że te małe GTP-azy odgrywają również ważną rolę w procesie regulacji programowanej śmierci komórki (PCD) [4]. Rho zostało również scharakteryzowane jako regulator organizacji cytoszkieletu aktynowego. Badania dowiodły, że Rho stymuluje oraz reguluje formowanie włókien naprężeniowych zbudowanych z aktyny, jest mediatorem uczestniczącym w reorganizacji struktur aktynowych, m.in. w komórkach nerwowych. Pełni ponadto rolę w regulacji ruchliwości komórek np. neutrofilii. Działanie Rho polega m.in. na regulacji fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny [31]. Białko Rac1 promuje reorganizację aktyny w struktury zwane lamellipodiami, które są formowane na brzegu wiodącym komórki w pierwszym etapie jej ruchu [11,30]. Inne białko należące do tej rodziny – RhoA, wpływa na formowanie ognisk adhezji, co promuje przyczepianie się komórek do podłoża. Białko RhoE natomiast powoduje destabilizację tych struktur, a w konsekwencji zaokrąglenie komórki [30]. Zmiany dynamiki cytoszkieletu regulowane przez GTP-azy Rho wiążą się z transportem wewnątrzkomórkowym, powstawaniem połączeń międzykomórkowych, cytokinezą oraz wpływają na polarność komórki. Dynamiczne rearanżacje cytoszkieletu powodowane aktywnością białek Rho wpływają na kształt komórki, kontakt między komórkami oraz między komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową. Odzwierciedleniem tego jest wpływ na inwazyjność oraz zdolność komórek nowotworowych do metastazy [5,30].

Kolejną ważną funkcją, jaką pełnią GTP-azy Rho jest regulacja aktywności wielu czynników transkrypcyjnych. Białka Rac1, RhoA oraz Cdc42 aktywują SRF (serum response factor), który przez współdziałanie z innymi czynnikami moduluje aktywność SRE (serum response element) [16]. Białka Rho aktywują także wiele innych czynników transkrypcyjnych. Ich różnorodność, podlegająca regulacji przez małe białka G sugeruje, że białka Rho pełnią funkcję mediatorów transformacji [30].

Wykazano, że podrodzina małych białek G jest w stanie regulować postęp cyklu komórkowego oraz stymulować proliferację komórek. Aktywne postaci białek Rac1, RhoA oraz Cdc42 wpływają na postęp fazy G1 cyklu komórkowego poprzez modulowanie zarówno pozytywnych jak i negatywnych regulatorów supresora nowotworu Rb, którego zadaniem jest regulowanie postępu fazy G1. RhoA pełni funkcję antagonisty ekspresji dwóch negatywnych regulatorów progresji fazy G1: cyklinozależnych inhibitorów kinazy p21^{CIP1} oraz p27^{KIP1}. Inhibicja p21^{CIP1} jest jednym z mechanizmów, dzięki którym GTP-azy Rho mogą uaktywnić białka Ras, będące jednostkami stymulującymi wzrost komórki [24,30].

WPLYW BIAŁEK RHO NA ORGANIZACJĘ CYTOSZKIELETU

Jak dotąd najlepiej poznаныmi białkami rodziny Rho są Cdc42, Rac1 oraz RhoA. Hall i wsp. [15] w swoich bada-

niach wykazali, że aktywacja poszczególnych białek tej rodziny prowadzi do formowania struktur zbudowanych z aktyny. Aktywacja Cdc42 stanowi sygnał do formowania filopodiów, Rac1 reguluje powstawanie lamellipodiów, RhoA natomiast wpływa na formowanie włókien naprężeniowych oraz ognisk kontaktowych [18,33,35]. Białko Cdc42 bierze udział w odbieraniu sygnałów z przestrzeni międzykomórkowej, stymulując wydłużanie filopodiów oraz wpływa na ustalenie polarności komórki podczas ukierunkowanej migracji. Wydłużanie lamellipodiów przez polimeryzującą aktynę przy krawędzi wiodącej komórki jest kontrolowane przez GTP-azę Rho – Rac1 [6,11]. Kolejne białko rodziny małych białek G, RhoA, stymuluje polimeryzację aktyny przez aktywację białek Dia (zwanymi również DRFs - diaphanous-related formins), które stymulują dodawanie monomerów aktyny do końca (+) plus filamentu. DRF współdziałają razem z kinazami ROCK, co prowadzi ostatecznie do powstania włókien naprężeniowych [15,38].

Współdziałanie ROCK z DRF odgrywa główną rolę w regulacji polarności komórki oraz organizacji mikrotubul. Ich stabilność jest regulowana przez kinazę ROCK, odpowiedzialną za fosforylację białek Tau oraz MAP2. Działanie DRF, polegające na stabilizowaniu oraz koordynowaniu orientacji mikrotubul, wywołane jest przez miejscową aktywację białek Rho z udziałem szlaku integryna/FAK [38].

Małe białka G, głównie białka Ras oraz Rho wzajemnie na siebie oddziałują. Ras mają zdolność aktywacji Rac (dlatego Ras indukuje powstawanie lamellipodiów), Cdc42 wpływają na Rac, które z kolei inicjują działanie Rho. Oddziaływania między białkami rodzin Rho i Rac wskazują, że są one głównymi molekułami, które odbierają sygnały z receptorów powierzchniowych i wpływają na organizację cytoszkieletu aktynowego [18]. Machesky i Hall w badaniach nad rolą polimeryzacji aktyny i adhezji dowiedli, że Rac indukuje szybkie tworzenie filamentów aktynowych w miejsce pofałdowań błony komórkowej, podczas gdy Rho powoduje montaż włókien naprężeniowych przez formowanie skupień włókien F-aktyny. Aktywacja zarówno Rac jak i Rho prowadzi do formowania kompleksów adhezyjnych, w których powstawaniu pośredniczą integryny. Łączenie się cząsteczek integryny nie jest wymagane w indukowanym przez Rho tworzeniu skupień aktomiozynowych wiązek filamentów oraz przy wiązaniu z pęczkami aktyny. Jest natomiast konieczne podczas tworzenia włókien naprężeniowych. Białka Rac i Rho wywołują zmiany cytoszkieletu w dwóch kierunkach. Lamellipodia powstają niezależnie od tworzenia kompleksów integryn na skutek miejscowej polimeryzacji aktyny z udziałem białek Rac w części peryferyjnej komórki. Natomiast włókna naprężeniowe powstałe w następstwie działania białek Rho są tworzone poprzez zależne od kompleksów integryn formowanie pęczków filamentów aktynowych [22].

Rodzina białek Rho jest głównym regulatorem organizacji cytoszkieletu. Dzieje się to w wyniku działania GTP-az Rho na białka efektorowe, takie jak: kinazy Rho-zależne (ROCK1, ROCK2) i białka mDia (mDia1,2). Aktywacja mDia z udziałem Rho inicjuje polimeryzację aktyny dzięki białku wiążącemu aktynę – profilinie. Białko mDia reguluje natomiast formowanie i organizację mikrotubul. Kinazy ROCK1,2 aktywują kinazy LIM1 i LIM2, które powodują

Tabela 1. Wpływ białek rodziny Rho na organizację cytoszkieletu (wg [3] zmodyfikowano)

GTP-azy	Występowanie	Działanie na cytoszkielet aktynowy
Rac1	powszechnie	lamellipodia, pofałdowanie błon, ogniska kontaktowe
Rac2	komórki krwiotwórcze	aktywowanie oksydazy NADHP, ogniska kontaktowe
Rac3	serce, łożysko, mózg, trzustka	formowanie ognisk kontaktowych, lamellipodia
RhoG	powszechnie	pofałdowanie błony, lamellipodia
Cdc42	powszechnie	filopodia, dezorganizacja włókien naprężeniowych
TC10	mięśnie szkieletowe, serce, wątroba	dezorganizacja włókien naprężeniowych, tworzenie ognisk kontaktowych
Rnd1 (Rho6)	mózg, wątroba	dezorganizacja włókien naprężeniowych, zniesienie adhezji
Rnd2 (Rho7)	jądra, mózg, wątroba	dezorganizacja włókien naprężeniowych, zniesienie adhezji
RhoE (Rnd3)	powszechnie	dezorganizacja włókien naprężeniowych (komórki MDCK), pofałdowanie błony (makrofagi)
RhoA	powszechnie	tworzenie ognisk kontaktowych i włókien naprężeniowych
RhoB	powszechnie	włókna naprężeniowe
RhoC	powszechnie	włókna naprężeniowe
RhoH (TTF)	komórki krwiotwórcze	brak wpływu na cytoszkielet aktynowy
RhoD (HP1)	powszechnie (niski poziom w mózgu i komórkach krwiotwórczych)	pofałdowanie błony, dezorganizacja włókien naprężeniowych, filopodia
Rif	powszechnie	filopodia
Miro-1	powszechnie	brak wpływu na cytoszkielet aktynowy (występuje jedynie w mitochondrium)
Miro-2	powszechnie	brak wpływu na cytoszkielet aktynowy (występuje jedynie w mitochondrium)
RhoBTB-1	powszechnie	umiarkowany wpływ na organizację włókien naprężeniowych
RhoBTB-2	mózg	umiarkowany wpływ na organizację włókien naprężeniowych

fosforylację kofiliny – białka odpowiedzialnego m.in. za depolimeryzację F-aktyny, prowadząc do jej inaktywacji. Zwiększa to intensywność polimeryzacji filamentów aktynowych oraz wpływa na stabilizację włókien naprężeniowych. Kinazy ROCK1,2 fosforylują lekkie łańcuchy miozyny (MLC-P), co zwiększa kurczliwość miozyny i hamuje fosfatazę MLC (MLC-PPaza). Aktywacja kinaz ROCK1,2 przez GTP-azy Rho prowadzi zarówno do formowania aktynowych włókien naprężeniowych, jak i do zwiększenia kurczliwości struktur włóknistych (aktomiozynowych), co obserwuje się m.in. w takich procesach jak: formowanie kompleksów integrzyn, tworzenie ognisk kontaktowych, a także w adhezji komórek (ryc. 3) [6].

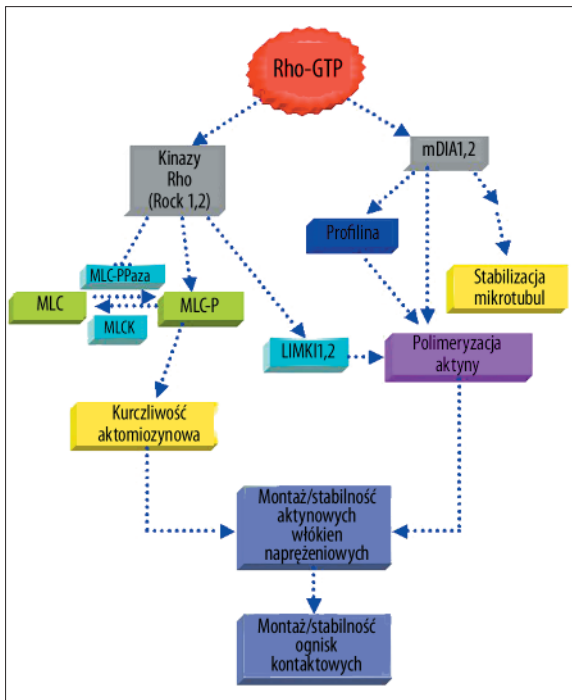
SZLAKI SYGNALIZACYJNE Z UDZIAŁEM BIAŁEK RHO

Białka rodziny Rho funkcjonujące na zasadzie molekularnych przełączników kontrolują poprzez kaskady sygnalizacyjne organizację i dynamikę cytoszkieletu aktynowego. Droga sygnałowa z udziałem białek Rho jest inicjowana przez różne receptory znajdujące się na błonie komórkowej. Są to m.in.: receptor kinazy tyrozynowej, receptory cytokin czy też receptory wiążące białka G. Stymulacja tych receptorów zachodzi m.in. przez ligandy (kwas lizofosfatydowy, bombezyna, bradykinina czy trombina) oraz

z udziałem cząsteczek adhezyjnych, takich jak integryny, kadhedryny i białka nadrodziny immunoglobulin [12,20]. Białka Rho odbierają również sygnały z receptorów aktywowanych przez naskórkowy i płytkopochodny czynnik wzrostu (EGF, PDGF), czy też przez insulinę [20]. Receptory aktywują białko regulatorowe GEF odpowiedzialne za przejście nieaktywnego białka Rho związane go z GDP w aktywne, połączone z GTP [3].

Dotąd poznano wiele białek, które wiążą się z aktywną postacią białek Rho i pełnią funkcję białek efektorowych. Na szczególne zainteresowanie zasługuje kinaza ROCK (Rho kinase), zwana również p160Rho [2,12]. ROCK jest kinazą serynowo/treoninową, zidentyfikowano ją prawie 10 lat temu jako białko wiążące się z Rho-GTP. Występuje w postaci dwóch izoform ROCK1 i ROCK2. Kinazy te wykazują swoistość tkankową. Izoformy ROCK1 występują głównie w takich narządach jak serce, płuca, mięśnie szkieletowe, natomiast ROCK2 jest obecna przede wszystkim w mózgu. Kinazy ROCK pełnią istotne funkcje w procesach migracji komórki, proliferacji oraz są odpowiedzialne za przeżycie komórki [25]. Wpływają na kształt komórek wpływając na kurczliwość struktur aktynowych i miozynowych [11]. Nieprawidłowa aktywacja drogi sygnałowej Rho/ROCK prowadzi do wielu zaburzeń ośrodkowego układu nerwo-





Ryc. 3. Regulacja cytoszkieletu przez białka Rho (wg [6] zmodyfikowano)

wego [25]. Kinaza ta została odkryta i scharakteryzowana jako białko pośredniczące w indukowanym przez Rho formowaniu włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych [20]. Kinazy ROCK prowadzą do fosforylacji wielu białek. Jednym z głównych substratów kinazy ROCK jest lekki łańcuch miozyny MLC (myosin light chain). Fosforylacja MLC prowadzi do formowania struktur aktomiozynowych. ROCK pośrednio reguluje ilość ufosforylowanych MLC poprzez inaktywowanie fosfatazy MLC, czyli MLCP [12]. Kolejnym substratem kinaz ROCKs są Ser/Thr kinazy LIM (LIMK1 i LIMK2). Ufosforylowana kinaza LIM prowadzi do zahamowania działania kofiliny (przez fosforylację), a co się z tym wiąże do stabilizacji struktur zbudowanych z filamentów aktynowych [7,26]. ROCK fosforyluje również białka z rodziny ERM (ezrin, radexin, moesin) oraz inne białka zaangażowane w regulację cytoszkieletu. Substratami są również białka filamentów pośrednich, takie jak: wimentyna, kwaśne fibrylarne białka glejowe, neurofilamenty, które podczas fosforylacji przez ROCK ulegają depolimeryzacji [2,12]. Także białka towarzyszące mikrotubulom tzw. MAP2 (microtubule associated protein) oraz białka tau, należą do substratów kinazy ROCK. Fosforylacja białek tau zmniejsza ich aktywność, co promuje formowanie mikrotubul *in vitro* [25]. Aktywność kinazy ROCK wzrasta w niewielkim stopniu po związaniu Rho-GTP. Leung i wsp. [12] udowodnili, że nadekspresja białka kinazy aktywowanej przez Rho powoduje formowanie się włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych w komórce [12].

Drugim ważnym działaniem białek Rho jest wpływ na syntezę fosfatydyloinozytolu-4,5-bisfosforanu, PI(4,5)P₂. Kinaza fosforylująca fosfatydyloinozytolo-4-fosforan jest aktywowana bezpośrednio przez wiązanie się z aktywną postacią białka Rho [32]. Stymulacja syntezy PI(4,5)P₂ może wpływać na reorganizację aktyny poprzez białka

wiążące aktywną, tzw. białka ABP (m.in. profilina, kofilina, α -aktylina, winkulina, spektryna), a co się z tym wiąże na formowanie włókien naprężeniowych i ognisk kontaktowych [12]. Profilina jest niezbędna do formowania połączeń pomiędzy włóknami naprężeniowymi oraz ogniskami kontaktowymi [20].

Kolejnym fizjologicznie aktywnym efektem białek Rho jest białko p140mDia. Stymuluje ono polimeryzację aktyny na dwa sposoby, bezpośrednio lub pośrednio przez oddziaływanie z mikrotubulami czy przez interakcje z profiliną, wiążącą monomery aktynowe i promującą polimeryzację. Białko p140mDia jest istotnym czynnikiem regulującym ilość i strukturę włókien naprężeniowych [20].

BIAŁKA RHO A POLIMERYZACJA AKTYNY

W komórkach eukariotycznych G-aktyna pozostaje w dynamicznej równowadze ze spolimeryzowaną F-aktyną. Wzrost filamentów F-aktyny zachodzi na końcach plus (barbed ends), natomiast demontaż na końcach minus (pointed ends). Polimeryzacja na końcu plus podlega kontroli przez białka czapeczkujące (np. gelsolina), które przyłączają się z dużym powinowactwem i zapobiegają elongacji filamentów aktynowych. Polimeryzacja aktyny wywołwana jest przez wiele mechanizmów, jednym z nich jest nukleacja *de novo* wywołana przez kompleks białek ARP2/3 (actin related protein 2/3). W wyniku tego procesu dochodzi do formowania sieci rozgałęzień F-aktyny w kształcie litery Y. Mechanizm ten jest istotny podczas fagocytozy, migracji komórki oraz w jej polaryzacji [12,22]. Kompleks ARP2/3 aktywowany jest przez cząsteczki ATP, a kontrola tego procesu zachodzi z udziałem wielu białek [1,35,36]. Należą do nich białka rodziny WASP (Wiskott-Aldrich syndrom protein), nerwowe (N-) WASP oraz trzy izoformy białek SCAR/WAVE (WASP family verprolin homologous protein) [1,2,35]. Białka rodziny WASP mają na karboksylowym końcu domenę WCA, do której przyłącza się kompleks ARP2/3. Natomiast w regionie N-terminalnym białek WASP znajduje się domena GBD odpowiadająca za wiązanie GTP-azy Cdc42, jednego z najlepiej scharakteryzowanych białek rodziny Rho. Domena WCA inicjuje nukleację aktyny z udziałem kompleksu ARP2/3. Białka WASP podlegają autoinhibicji przez łączenie regionu centralnego domeny WCA z domeną B/GBD, która znajduje się w pobliżu regionu odpowiedzialnego za przyłączanie Cdc42/Rac. Autoinhibicja może zostać zahamowana, gdy z domeną GBD zwiąże się postać Cdc42 z przyłączonym GTP. W ten sposób białko rodziny Rho ma możliwość bezpośrednio aktywować nukleację aktyny [1,35].

CYTOSZKIELET A APOPTOZA – WPLYW BIAŁEK RHO

Podczas apoptozy komórka podlega charakterystycznym zmianom morfologicznym, m.in. kurczy się, chromosomy ulegają kondensacji, tworzą się pęcherzyki apoptotyczne [28]. Wiele badań zostało poświęconych organizacji aktyny podczas zmian błony cytoplazmatycznej w procesie programowanej śmierci komórki [6,9,14,27]. Dowiedziono, że F-aktyna jest konieczna podczas uwypuklenia błony komórkowej w celu formowania pęcherzyków (blebbing) oraz tworzenia ciałek apoptotycznych [14,23]. Ilość F-aktyny koreluje z wielkością pęcherzyków. Jest ona obecna w podstawie formujących się pęcherzyków podczas apop-

tozy i ulega trawieniu przez kaspazy. Jednak nie tylko aktywna odgrywa istotną rolę podczas zmian strukturalnych prowadzących do wytworzenia pęcherzyków apoptotycznych. Na podstawie modelu doświadczalnego stworzonego przez Millsa i wsp. [23] udowodniono, że tworzenie wypukleń błony komórkowej połączone z wytworzeniem pęcherzyków jest regulowane przede wszystkim przez fosforylację lekkiego łańcuchów miozyny MLC. Fosforylacja MLC pozwala konwencjonalnej miozynie (miozyna II) przyłączyć aktyne, co prowadzi do wytworzenia siły warunkującej ruchliwość, kurczenie się komórek. W fosforylacji MLC pośredniczy swoista miozynowa fosfataza MLCK (kinaza lekkich łańcuchów miozyny) oraz ROCK (kinaza Rho zależna). ROCK odgrywa podwójną rolę, po pierwsze bezpośrednio w fosforylacji i aktywacji MLC, po drugie pośrednio przez inhibicję fosfatazy MLC (ryc. 3) [23].

Skojarzenie funkcji miozyny II z mechanizmem powodującym powstanie wypukleń błony komórkowej prowadzącym do wytworzenia pęcherzyków pozwoliło stworzyć model, wyjaśniający zmiany morfologiczne komórki we wczesnej fazie wykonawczej apoptozy. Skurcze pierścienia aktynowego usytuowanego w części peryferycznej komórki, tuż pod błoną komórkową, powodują wytworzenie siły dośrodkowej, która implikuje koncentrację cytoplazmy w obrębie centrum komórki. Jeżeli białka strukturalne (fodryna, ABP – białka wiążące aktyne), łączące błonę komórkową z warstwą korową aktyny ulegną inaktywacji, wówczas siła dośrodkowa wepchnie pierścień aktynowy do wewnątrz komórki i spowoduje wypchnięcie cytoplazmy w miejscach osłabionego wiązania aktyny z błoną cytoplazmatyczną. Ostatecznie objawia się to wytworzeniem pęcherzyków i potwierdza, że siła skurczowa potrzebna do wytworzenia pęcherzyków jest generowana przez struktury aktomiozynowe [9,23].

Destabilizacja mikrotubul odgrywa istotną rolę w regulacji tworzenia ciałek apoptotycznych. Mikrotubule ulegają dezorganizacji podczas końcowych etapów apoptozy, co prowadzi do kurczenia się komórek apoptotycznych. Jest to związane ze zwiększeniem fosforylacji MLC [23,24].

Hangmann i wsp. [14] potwierdzili, że tworzenie pęcherzyków na skutek wypuklenia błony cytoplazmatycznej jest regulowane przez trzy podstawowe elementy cytoskieletu: mikrofilamenty, filamenty pośrednie oraz mikrotubule. Przedstawili oni model, w którym krótkotrwałe formowanie pęcherzyków poprzez aktywację miozyny było indukowane kwasem lizofosfatydowym (LPA). Jako pierwsi bezpośrednio wykazali, że akumulacja aktyny wzdłuż przestrzeni cytoplazmatycznej błony pęcherzyka wiąże się z fazą apoptozy, w której następuje kurczenie się pęcherzyka [14].

Białka rodziny Rho pełnią wiele istotnych funkcji w procesach apoptotycznych. Udowodniono, że biorą udział w reorganizacji cytoskieletu podczas apoptozy, wpływając tym samym na zmiany w morfologii komórek apoptotycznych [9,23,27]. Rho, należące do małych białek G regulując fosforylację lekkich łańcuchów miozyny (MLC) odgrywają istotną rolę podczas tworzenia pęcherzyków na początku fazy wykonawczej programowanej śmierci komórki. W fosforylacji MLC zaangażowane są ROCK i MLCK. Rho pośredniczy w fosforylacji MLC przez ak-

tywację ROCK. Kinaza zależna od Rho fosforyluje serynę w pozycji 19, tak jak MLCK. ROCK fosforyluje ponadto i inaktywuje podjednostkę fosfatazy MLC, powodując zwiększenie fosforylacji MLC [6]. W badaniach przeprowadzonych przez Millsa i wsp. [23] wykazano, że białka Rho, które zwiększają fosforylację MLC, pełnią istotne funkcje podczas formowania pęcherzyków apoptotycznych. Inaktywacja białek Rho w komórkach ulegających apoptozie prowadzi do zahamowania procesów, które prowadzą do wytworzenia ciałek apoptotycznych [23].

Najlepiej dotąd scharakteryzowanym przedstawicielem rodziny małych białek G, zaangażowanym w procesy regulacji zmian morfologicznych komórek ulegających apoptozie jest RhoA. Odpowiada ono m.in. za formowanie aktynowych włókien naprężeniowych oraz za generowanie siły skurczowej przez kompleks aktyny i miozyny II. Zaproponowano, że to właśnie RhoA jest odpowiedzialne za kurczenie się komórek i formowanie pęcherzyków podczas apoptozy [9]. Dzieje się to przede wszystkim w wyniku aktywacji przez RhoA określonych białek efektorowych, głównie ROCK1 i ROCK2.

Badania prowadzone przez Colemana i wsp. [9] wykazały również, że białko efektorowe GTP-az Rho, jakim jest ROCK1 wpływa na procesy mające związek ze zmianami morfologii komórki podczas apoptozy, dzięki aktywacji ROCK1 przez kaspazy. Prowadzi to do fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny, aktywacji miozyny ATP-azowej i sprzężenia filamentów aktomiozynowych z błoną cytoplazmatyczną. Aktywność ROCK1 jest konieczna i jednocześnie wystarczająca zarówno do formowania pęcherzyków na skutek wypukleń błony, jak również do relokalizacji fragmentów DNA do pęcherzyków i ciałek apoptotycznych [9].

Kinazy Rho regulują nie tylko fragmentację, ale również fagocytozę komórek apoptotycznych, co udowodnili Orlando i wsp. [27]. Wykazali oni, że przekazywanie sygnałów z udziałem ROCK1 wpływa na regulację fragmentacji umierającej komórki i upakowanie produktów jej rozkładu w ciała apoptotyczne. Zaproponowali model doświadczalny, w którym ROCK1 jest rozcinana i aktywowana przez kaspazy podczas programowanej śmierci komórki, oraz że aktywna ROCK1 zwiększa siłę skurczową struktur aktomiozynowych. Prowadzi to z kolei do fragmentacji i wytworzenia ciałek apoptotycznych. Po raz pierwszy zauważyli i potwierdzili w swoich badaniach, że aktywacja ROCK1 odrywa istotną rolę podczas przygotowania komórek do procesu fagocytozy poprzez kontrolę ich fragmentacji [27].

Aktywacja kinazy Rho-zależnej przyczynia się do generowania siły skurczowej struktur aktomiozynowych poprzez fosforylację wielu białek efektorowych. Zależna od Rho aktywacja LIMK1 i LIMK2 prowadzi do fosforylacji i inaktywacji kofiliny. ROCK fosforyluje bezpośrednio MLC, kalponinę oraz białko CPI-17, co również prowadzi do zwiększenia siły skurczowej struktur aktomiozynowych. Reasumując, aktywacja ROCK objawia się tym, że komórka może się kurczyć i tworzyć charakterystyczne struktury obserwowane podczas apoptozy [8].

Kinaza Rho-zależna może być aktywowana dwiema drogami, albo dzięki kaspazom, albo dzięki małym białkom G.



Obydwa te szlaki prowadzą do generowania skurczów aktomiozynowych, koniecznych podczas zmian morfologicznych w procesie programowanej śmierci komórki.

PODSUMOWANIE

Białka należące do rodziny Rho wpływają na wiele procesów komórkowych. Wielu badaczy zajmuje się analizowaniem tej całej grupy powiększającej grupy białek, a w ciągu ostatnich lat dokonał się znaczący postęp w zrozumieniu zarówno biochemicznej, jak i genetycznej natury procesów, w które są zaangażowane białka Rho. Rodzina GTP-az Rho wpływa na organizację cytoszkieletu komórki i adhezję komórek. Białka te są zaangażowane również w takie procesy komórkowe, jak: migracja, transport pęcherzykowy, regulacja transkrypcji, egzocytosis, cykl komórkowy i apoptoza. Wpływ białek Rho na organizację cytoszkieletu przejawia się w ustalaniu polarności komórki, wydłużaniu filopodiów (Cdc42), wydłużaniu lamellipodiów poprzez

polimeryzację aktyny (Rac1) oraz tworzeniu włókien naprężeniowych (RhoA). Ponadto, białka te dzięki oddziaływaniu na ROCK stabilizują i koordynują orientację mikrotubul. Wykazano również, że zwiększają one kurczliwość struktur włóknistych, co zaobserwowano podczas formowania kompleksów integrzyn, tworzeniu ognisk kontaktowych i adhezji komórek. Cytoszkielet aktynowy stanowi dynamiczny układ, który podlega ciągłym przeobrażeniom. Białka rodziny Rho pełnią nadrzędną funkcję w kontrolowaniu zjawisk komórkowych powiązanych z reorganizacją cytoszkieletu. Stanowią one główny regulator tych procesów a poprzez interakcje z białkami docelowymi, zapewniają skoordynowaną regulację innych czynności komórkowych, takich jak transkrypcja genów oraz adhezja, a także ruch komórkowy oraz apoptoza. Dokładne poznanie funkcji regulacyjnych białek Rho podczas istotnych procesów komórkowych, w które białka te są zaangażowane prawdopodobnie pozwoli w przyszłości na ich potencjalne wykorzystanie w terapii wielu schorzeń.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aktories K., Barbieri J.T.: Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005; 5: 397–410
- [2] Aspenström P.: Effectors for the Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1999; 11: 95–102
- [3] Aspenström P., Fransson A., Saras J.: Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem. J.*, 2004; 377: 327–337
- [4] Aznar S., Lacal J.C.: Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett.*, 2001; 165: 1–10
- [5] Begum R., Nur-E-Kamal M.S., Zaman M.A.: The role of Rho GTPases in the regulation of rearrangement of actin cytoskeleton and cell movement. *Exp. Mol. Med.*, 2004; 36: 358–366
- [6] Besson A., Assoian R.K., Roberts J.M.: Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 948–955
- [7] Bishop A., Hall A.: Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.*, 2000; 348: 241–255
- [8] Coleman M.L., Olson M.F.: Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2002; 9: 493–504
- [9] Coleman M.L., Sahai E.A., Yeo M., Bosch M., Dewar A., Olson M.F.: Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell. Biol.*, 2001; 3: 339–345
- [10] Corbett K.D., Alber T.: The many faces of Ras: Recognition of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 2001; 26: 710–716
- [11] Etienne-Manneville S., Hall A.: Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002; 420: 629–635
- [12] Fabczak H.: Rodzina białek Rho a cytoszkielet. *Kosmos*, 2001; 252: 283–293
- [13] Fleming I.N., Elliott C.M., Exton J.H.: Differential translocation of rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 33067–33073
- [14] Hagmann J., Burger M.M., Dagan D.: Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.*, 1999; 73: 488–499
- [15] Hall A., Nobes C.D.: Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2000; 355: 965–970
- [16] Hill C.S., Wynne J., Treisman R.: The Rho family GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42Hs regulated transcriptional activation by SRF. *Cell*, 1995; 81: 1159–1170
- [17] Hornstein I., Alcover A., Katav S.: Vav proteins, masters of the world cytoskeleton organization. *Cell Signal.*, 2004; 16: 1–11
- [18] Karnoub A.E., Der C.J.: Rho family GTPases and cellular transformation. *Eurekah Bioscience* 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eurekah.chapter.39185> (27.02.2008)
- [19] Kjoller L., Hall A.: Signalling to Rho GTPases. *Exp. Cell. Res.*, 1999; 253: 166–179
- [20] Kłopocka W., Barańska J.: Rola rodziny białek Rho w kontroli migracji komórek pełzających. *Post. Biochem.*, 2005; 54: 36–43
- [21] Luo L.: Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2000; 1: 173–180
- [22] Machesky L.M., Hall A.: Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.*, 1997; 138: 913–926
- [23] Mills J.C., Stone N.L., Erhardt J., Pittman R.N.: Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell Biol.*, 1998; 140: 627–636
- [24] Moon S.Y., Zheng Y.: Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.*, 2003; 13: 13–22
- [25] Mueller B.K., Mack H., Teusch N.: Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2005; 4: 387–398
- [26] Olson M.F., Paterson H.F., Marshall C.J.: Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature*, 1998; 394: 295–259
- [27] Orlando K.A., Stone N.L., Pittman R.N.: Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.*, 2006; 312: 5–15
- [28] Ostrowski M., Grzanka A., Izdebska M.: Rola aktyny w chorobie Alzheimer. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 224–228
- [29] Ridley A.: Rho family proteins: coordinating cell response. *Trends Cell Biol.*, 2001; 11: 471–477
- [30] Ridley A.: Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2001; 2: 303–310
- [31] Ridley A.J.: The GTP-binding protein Rho. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997; 29: 1225–1229
- [32] Small J.V., Rottner K., Kaverina I.: Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999; 11: 54–60
- [33] Small J.V., Stradal T., Vignall E., Rottner K.: The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.*, 2002; 12: 112–120
- [34] Song Y., Hoang B.Q., Chang D.D.: ROCK-II-induced membrane blebbing and chromatin condensation require actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.*, 2002; 278: 45–52
- [35] Tapon N., Hall A.: Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the organization of the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997; 9: 86–92
- [36] Weed S.A., Parsons J.T.: Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene*, 2001; 20: 6418–6434
- [37] Wennerberg K., Der C.J.: Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 1301–1312
- [38] Wheeler A.P., Ridley A.J.: Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.*, 2004; 301: 43–49
- [39] Yonemura S., Hirao-Minakuchi K., Nishimura Y.: Rho localization in cell and tissues. *Exp. Cell Res.*, 2004; 295: 300–314